

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年3月4日 (04.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/018085 A1

(51) 国際特許分類: B01D 67/00, 63/02, 65/02, 69/08, 71/40, C08J 7/18, 7/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010488

(22) 国際出願日: 2003年8月20日 (20.08.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-240247 2002年8月21日 (21.08.2002) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP]; 〒103-8666 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてののみ): 上野 良之

(UENO, Yoshiyuki) [JP/JP]; 〒520-0842 滋賀県 大津市 園山2丁目13番1号 Shiga (JP). 高橋 博 (TAKA-HASHI, Hiroshi) [JP/JP]; 〒607-8088 京都府 京都市 山科区竹鼻地蔵寺南町16-A1-31 Kyoto (JP). 菅谷 博之 (SUGAYA, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒520-2101 滋賀県 大津市 青山3丁目5番10号 Shiga (JP).

(74) 代理人: 岩見 知典 (IWAMI, Tomonori); 〒520-8558 滋賀県 大津市 園山1丁目1番1号 東レ株式会社知的財産部内 Shiga (JP).

(81) 指定国(国内): CA, CN, JP, KR, US.

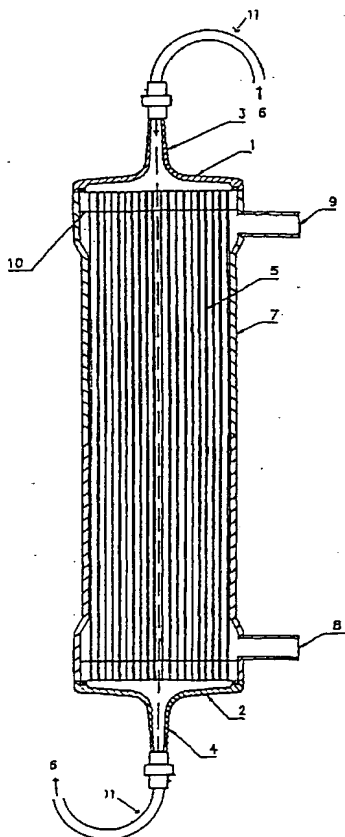
(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: MODIFIED SUBSTRATE AND PROCESS FOR PRODUCING MODIFIED SUBSTRATE

(54) 発明の名称: 改質基材および改質基材の製造方法



(57) Abstract: A modified substrate comprising a hydrophilic polymer in which the amount of soluble hydrophilic polymers contained is 15 wt.% or less and to which the sticking of human platelets amounts to 10 platelets / $4.3 \times 10^3 \mu m^2$ or less; and a process for producing a modified substrate, comprising exposing to radiation a substrate while in contact with an aqueous solution containing a hydrophilic polymer and an antioxidant. Thus, there are provided a modified substrate having a hydrophilic polymer immobilized on a substrate surface, which modified substrate ensures high blood compatibility, and a process for producing the same.

(57) 要約: 本発明は、親水性高分子を含み、可溶性親水性高分子量が15重量%以下であり、かつ、ヒト血小板付着量が10個/ $4.3 \times 10^3 \mu m^2$ 以下である改質基材である。また、本発明は、基材を親水性高分子および抗酸化剤を含む水溶液と接触下、放射線照射する改質基材の製造方法である。本発明により、親水性高分子が基材表面に固定化された、血液適合性の高い改質基材およびその製造方法が提供される。



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

改質基材および改質基材の製造方法

5 技術分野

本発明は、表面が親水化处理された改質基材に関する。本発明の改質基材は、医療用具に好適に用いることができる。また、水処理用分離膜、生体成分分離膜、バイオ実験関連器具、バイオリアクター、分子モーター、DDS（ドラッグ・デリバリー・システム）、タンパクチップ、DNAチップ、バイオセンサー、あるいは、分析機器部品などにも好適に用いることができる。なかでも生体成分と接触させて用いられる用途、例えば人工腎臓などの血液浄化用モジュールに好適に用いられる。

背景技術

15 人工血管、カテーテル、血液バッグ、コンタクトレンズ、眼内レンズ、人工腎臓など、体液と接触する医療用具においては、生体適合性、特に血液適合性が大きな問題である。例えば、血液浄化に使用される分離膜では、タンパク質の付着や血小板の付着／活性化は血液凝固を引き起こす要因となる。このような血液適合性の問題に対して、基材表面の親水化处理が有効であることが知られている。

20 血液浄化用分離膜の素材としては、例えば、ポリスルホン系ポリマーが用いられているが、血液適合性を付与するために、製膜原液の段階でポリビニルピロリドンなどの親水性高分子が混合されている。このような方法で、ある程度の血液適合性は得られているが、十分ではなかった。

基材表面の血液適合性を上げるために、ポリスルホン系の分離膜をポリビニル

25 ピロリドンなどの親水性高分子溶液と接触させ、分離膜に親水性高分子を物理吸着させる方法が、特開平10-118472号公報に開示されている。しかし、この方法では、親水性高分子は表面に吸着しているだけなので、血液と接触した際に、親水性高分子が血中に溶出してくる可能性が考えられる。また、ポリスル

ホン系の分離膜をポリビニルピロリドンなどの親水性高分子溶液と接触させ、放射線架橋により不溶化した親水性高分子被膜層を膜表面に形成する方法が、特開平 6-2 3 8 1 3 9 号公報に開示されている。この方法によれば、親水性高分子の溶出は抑制されるものの、不溶化された親水性高分子は、血液が接触した際に、
5 血小板を活性化するため、血液適合性は、かえって悪化してしまう。

発明の開示

本発明の目的は、親水性高分子が基材表面に固定化された、血液適合性の高い改質基材およびその製造方法を提供することにある。

10 本発明者らは鋭意検討を進めた結果、親水性高分子を必要以上に架橋もしくは崩壊させることなく、基材に固定化できる方法を見出し、本発明を完成させるに至った。

本発明は、親水性高分子を含み、可溶性親水性高分子量が 1 5 重量%以下であり、かつ、ヒト血小板付着量が $10 \text{ 個} / 4.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ 以下である改質基材
15 である。

また、本発明は、基材を親水性高分子および抗酸化剤を含む水溶液と接触させて放射線照射することによって得られうる改質基材である。

また、本発明は、上記の改質基材を用いた分離膜を含む。

また、本発明は、上記の改質基材を複数含むシステムを含む。

20 また、本発明は、基材を親水性高分子および抗酸化剤を含む水溶液と接触下、放射線照射する改質基材の製造方法である。

また、本発明は、複数の基材を含むシステムを親水性高分子および抗酸化剤を含む水溶液と接触させて、該複数の基材に同時に放射線照射するシステムの製造方法である。

25

図面の簡単な説明

第 1 図は、人工腎臓システムの基本構造の一例を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明では、基材を親水性高分子水溶液と接触させた状態で放射線照射することにより、親水性高分子が基材表面に固定化された改質基材を得る。基材の血液適合性は、血液と接触する部分の表面状態に依存し、一般的には、表面の親水性
5 が高いほど、また、表面に固定化された親水性高分子の運動性が高いほど、高くなる。運動性の高い親水性高分子は、その分子運動によって、タンパク質や血小板を排除していると考えられている。

なお、ここで言う固定化とは、親水性高分子が基材に結合している状態のことである。本発明においては、可溶性親水性高分子量が15重量%以下であることが必要であり、好ましくは10重量%以下である。ここで、可溶性親水性高分子
10 とは、架橋や基材への固定化による不溶化をされていない親水性高分子のことである。また、可溶性親水性高分子量とは、改質基材に含まれる全親水性高分子中の可溶性親水性高分子の割合である。詳細な測定方法は後述する。可溶性親水性高分子量が15重量%を越えると、親水性高分子の基材に対する結合が十分では
15 なく、改質基材が血液と接触した際に、親水性高分子が血中に溶出してくる可能性が考えられる。

また、親水性高分子の溶出量は、 0.5 mg/m^2 以下であることが好ましく、 0.3 mg/m^2 以下であればさらに好ましい。ここで、親水性高分子の溶出量
20 とは、基材を37℃に加温した純水に4時間接触させた場合に、純水中に溶け出した親水性高分子の量を、測定した基材の単位面積あたりの量に換算した値である。詳細な測定方法は後述する。親水性高分子の溶出量が上記の範囲を超えると、血液と接触する医療用具の場合は、患者の体内への蓄積が懸念される。親水性高分子の分子量が5万を越える場合は、腎臓でろ過されないため、体外に排出されず、特に蓄積が懸念される。また、人工腎臓に用いる場合は、腎機能が低下もし
25 くは損失している患者に使用するために、親水性高分子の分子量が5万以下の場合でも、患者の体内への蓄積が懸念される。また、タンパクチップやバイオセンサーといった分析機器に用いる場合においては、溶出した親水性高分子が分析の阻害因子となりうることを懸念される。

放射線照射の条件は、基材と接触した親水性高分子水溶液において、放射線照射による、波長 260 nm から 300 nm の範囲における紫外吸収値の最大増加値が 1 以下であることが好ましく、0.5 以下がより好ましい。ここでいう紫外吸収値の最大増加値とは、放射線照射後の親水性高分子水溶液の 260 nm から 300 nm の範囲における紫外吸収値から、放射線照射前の親水性高分子水溶液の同じ波長範囲における紫外吸収値を差し引いて得られた値のうち、該波長範囲において最大の値のことを指す。放射線照射の条件によっては、親水性高分子が崩壊し、260 nm から 300 nm の波長領域に吸収を有する比較的反応性の高い物質を生成することがある。特に医療用具の場合においては、このような物質は、安全性の面から少ないほうが好ましい。

また、本発明の改質基材は、表面親水性高分子量が 20 重量%以上であることが好ましい。ここで、表面親水性高分子量とは、改質基材の表面における親水性高分子のモノマーユニットの重量（モノマーユニットのモル数×モノマーユニットの分子量）を（A）、改質基材の表面における基材を構成する高分子のモノマーユニットの重量（モノマーユニットのモル数×モノマーユニットの分子量）を（B）としたときに、 $A / (A + B)$ で表される比率と定義する。表面親水性高分子量は、改質基材の表面の親水性の度合いを表すパラメータとなる。

表面親水高分子量は、改質基材の表面のみ、すなわち表面から深さ 10 nm 程度までを X 線光電子分光法（ESCA）により測定することで求められる。表面親水性高分子量は、20 重量%以上であることが好ましく、32 重量%以上であることがより好ましい。表面親水性高分子量が 20 重量%未満になると、タンパク質などの有機物や生体成分の付着を抑制する効果が低下する。これは、親水性高分子が基材表面を覆うことができず、基材が改質基材の表面に露出する割合が多くなるためと考えられる。

本発明の改質基材は、表面に親水性高分子が固定化されているとともに、親水性高分子の必要以上の架橋、崩壊などが防止されているので、タンパク質などの有機物や生体成分の付着を抑制することができる。特に、高い血液適合性を有する。具体的には、本発明の改質基材は、ヒト血小板付着量が 10 個 / 4.3×1

0³ μm²以下である。血小板付着量は、改質基材と血液を1時間接触させた場合に、改質基材の表面に付着した血小板の数を、改質基材の表面積4.3×10³ μm²あたりの数として求めた値である。詳細な測定方法は後述する。ヒト血小板付着量が10個/4.3×10³ μm²を越えると、血液適合性が不十分になる。とともに、タンパク質などの有機物や生体成分の付着を抑制する効果も不十分になる。

本発明の改質基材は、高い血液適合性を有するので、医療用基材として好適に用いることができる。本発明で用いられる医療用基材は、人工血管、カテーテル、血液バッグ、コンタクトレンズ、眼内レンズ、手術用補助器具、血液浄化用モジュールなどにおいて用いられるものを含む。なかでも生体成分と接触させて用いられる用途、例えば人工腎臓などの血液浄化用モジュールに適する。ここで、血液浄化用モジュールとは、血液を体外に循環させて、血中の老廃物や有害物質を取り除く機能を有したモジュールのことをいい、人工腎臓や外毒素吸着カラムなどがある。また、人工腎臓用モジュールとしては、コイル型、平板型、中空糸膜型があるが、処理効率などの点から、中空糸膜型が好ましい。

ところで、インターロイキン-6（以下、IL-6と略す）をはじめとするサイトカインなど生体に悪影響を与えうる物質を吸着除去する医療用基材がある。このような医療用基材も、血液適合性が高いことが望ましい。しかし、基材表面に親水化処理を行うと、血小板や凝固関連蛋白質の基材への付着が抑制されると同時に、IL-6などの除去対象物質の基材に対する吸着も抑制されてしまうことが懸念される。本発明の改質基材は、IL-6などのサイトカインの吸着を維持しつつ、高い血液適合性を得ることができる。具体的には、改質基材のサイトカイン吸着量を、改質前の基材のサイトカイン吸着量の90%以上に保ったまま、高い血液適合性を有する改質基材を得ることができる。本発明の改質基材は、IL-6吸着量が0.1 ng/cm²以上であることが好ましい。この範囲にあることにより、改質基材は、IL-6吸着カラムに好適に適用できる。

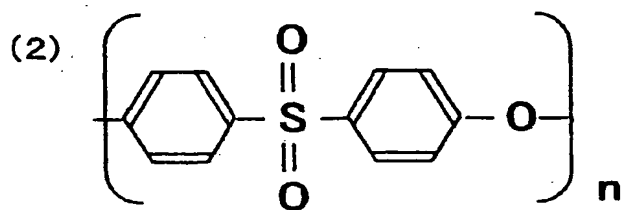
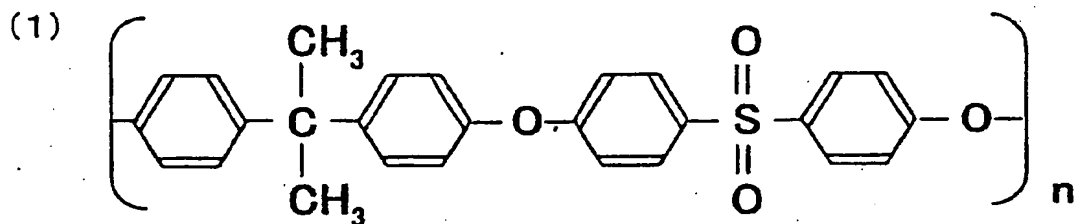
また、本発明の改質基材は、生体成分の付着を抑制するという特長を生かして、水処理用分離膜、生体成分分離膜、バイオ実験関連器具、バイオリアクター、分

子モーター、DDS、タンパクチップ、DNAチップ、バイオセンサー、あるいは、分析機器部品などにも好適に用いることができる。また、本発明の改質基材は、3次元架橋度の低い、親水性高分子が表面に存在するので、易滑性が必要な材料に対しての適用も期待できる。

- 5 本発明において、基材とは親水性を付与させたい材料のことを指す。基材は、高分子材料からなることが好ましい。高分子材料の例としては、ポリスルホン、ポリスチレン、ポリウレタン、ポリカーボネート、ポリメタクリル酸メチル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ沸化ビニリデン、ポリアクリロニトリル、ポリエステル、ポリアミドなどが挙げられる。また、これらの共重合体でも良い。
- 10 さらに炭素繊維やガラス状炭素板、カーボンシートなどの炭素板、カーボンナノチューブ、フラーレン等の炭素材料およびこれらと樹脂を混合したコンポジット材料も用いることができる。また、これらの素材の一部が官能基によって置換された材料も基材として適用できる。これらの、炭素材料における親水性付与の反応機構は定かではなく、直接反応するのか、炭素材料に物理的に拘束されている
- 15 微量の不純物と反応するのかは不明であるが、高分子材料と同様に親水性化させることが可能である。基材の形状としては、繊維、フィルム、樹脂、分離膜などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

- 医療用基材として用いる場合は、基材として、例えば、ポリ塩化ビニル、セルロース系ポリマー、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート、ポリカーボネート、
- 20 ポリスルホンやポリエーテルスルホンなどのポリスルホン系ポリマー、ポリウレタン、ポリアクリロニトリル、ポリ沸化ビニリデンなどが好ましい。この中でも特にポリスルホン系ポリマーは成形が容易で、分離膜にしたときの物質透過性能に優れているため、好適に用いられる。

- ポリスルホン系ポリマーは、主鎖に芳香環、スルフォニル基およびエーテル基
- 25 を持つもので、例えば、次式(1)および/または(2)の化学式で示されるポリスルホンが好適に使用される。式中の n は、50～80が好ましい。



ポリスルホンの具体例としては、ユーデル（登録商標）ポリスルホン P-1 7
 0 0、P-3 5 0 0（テイジンアモコ社製）、ウルトラソン（登録商標）S 3 0
 5 1 0、S 6 0 1 0（B A S F 社製）、ビクトレックス（登録商標）（住友化学）、
 レーデル（登録商標）A（テイジンアモコ社製）、ウルトラソン（登録商標）E
 （B A S F 社製）等のポリスルホンが挙げられる。また、本発明で用いられるポ
 リスルホンは上記式（1）および／または（2）で表される繰り返し単位のみか
 らなるポリマーが好適ではあるが、本発明の効果を妨げない範囲で他のモノマー
 10 と共重合していても良い。他の共重合モノマーは 1 0 重量％以下であることが好
 ましい。

また、I L-6 などのサイトカインを吸着除去する医療用基材に用いる場合は、
 基材は、疎水性高分子からなることが、吸着性能が高いため好ましい。特に、ポ
 リメタクリル酸メチルは、吸着性能が高いため好ましい。

15 また、本発明において、親水性高分子とは高分子の主鎖もしくは側鎖に親水性
 の官能基を含む高分子のことを指す。2 5℃の水に対する溶解度が好ましくは 0.
 0 0 1 重量％以上、より好ましくは 0. 0 1 重量％以上、さらに好ましくは 0.
 1 重量％以上の親水性高分子が本技術に適用しやすい。具体例としては、ポリビ

ニルピロリドン、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリエチレンイミン、ポリアリルアミン、ポリビニルアミン、ポリ酢酸ビニル、ポリアクリル酸、ポリアクリルアミドなどやこれらと他のモノマーとの共重合体や、グラフト重合体などが挙げられる。ポリアルキレングリコ

5. ール、ポリビニルピロリドン等の非イオン性親水性高分子は、非特異的吸着抑制効果を発揮する。ポリエチレンイミンなどのカチオン性親水性高分子は、酸化LDL等の酸性物質の吸着抑制に高い効果を発揮する。デキストラン硫酸、ポリビニル硫酸などのアニオン性高分子は、リゾチウムなどの塩基性物質の吸着抑制に高い効果を発揮する。中でも、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコ
- 10 ール等のポリアルキレングリコールまたはポリビニルピロリドンが、吸着抑制効果が高いことから好ましい。ポリビニルピロリドンは、特に吸着抑制効果が高い。また、ポリアルキレングリコールは、後述の抗酸化剤を添加しなくても、高い吸着抑制効果を発揮するというメリットを有する。

- 親水性高分子がポリアルキレングリコールの場合、ポリアルキレングリコール
- 15 固定化密度は、 150 mg/m^2 以上であることが好ましく、 200 mg/m^2 以上であることがさらに好ましい。また、ポリアルキレングリコール固定化密度は、 3000 mg/m^2 以下であることが好ましい。ここで、ポリアルキレングリコール固定化密度とは、基材表面に固定化されたポリアルキレングリコールの量である。ポリアルキレングリコール固定化密度が少なすぎると、基材の抗血栓性が
- 20 低下する。逆にポリアルキレングリコール固定化密度が多すぎると、サイトカインの吸着除去に用いた場合に、サイトカインの吸着能が低下する。基材表面に固定化された親水性高分子の量の測定は、基材および親水性高分子の種類によって異なり、適宜選ばれる。改質基材に結合している親水性高分子の量を直接測定することが好ましいが、より簡便な方法を用いても良い。たとえば、放射線照射前
- 25 の水溶液中の親水性高分子濃度と、放射線照射後の水溶液中の親水性高分子濃度の比較により、水溶液中の親水性高分子が減少した量を計算し、その量を固定化された親水性高分子の量としてもよい。また、表面の接触角が測定することにより、固定化された親水性高分子の量を推定することも簡便な方法である。

親水性高分子として、タンパク質などの生体由来の高分子を用いることも好ましい。基材に生体由来高分子が固定化されることにより、生体由来高分子の機能を基材に付与することができる。生体由来高分子の例としては、デキストランやデキストラン硫酸等の糖鎖構造を有する高分子、ペプチド、蛋白質、脂質、あるいはポリポリサッカライド等の複合物などが挙げられる。

また、複数の親水性高分子を用いることも好ましい。たとえば、非イオン性親水性高分子およびカチオン性親水性高分子を用いた場合、非イオン性親水性高分子が非特異的吸着抑制効果を発揮するのに加え、カチオン性親水性高分子が、酸化低密度リポ蛋白質（以下、酸化LDLと呼ぶ）等の酸性物質の吸着抑制に高い効果を発揮するので、両者の効果を併せ持たせることができる。また、非イオン性親水性高分子およびアニオン性高分子を用いた場合、非イオン性親水性高分子の非特異的吸着抑制効果に加えて、アニオン性高分子が、リゾチウムなどの塩基性物質の効率的吸着抑制効果を発揮する。また、合成親水性高分子と親水性の生体由来高分子を同時に用いた場合は、血液適合性が高く、かつ生体高分子のもつ機能が付与された改質基材を提供することができる。複数の親水性高分子を固定化する場合は、逐次固定化させることもできるが、一度に複数の親水性高分子の混合物を固定化することが簡便であり、より好ましい方法である。

親水性高分子の分子量は、100以上が好ましく、500以上がより好ましく、1000以上がさらに好ましい。また、親水性高分子の分子量は、5万以下が好ましい。

放射線は α 線、 β 線、 γ 線、X線、紫外線、電子線などが用いられる。また、人工腎臓などの医療用具は滅菌することが必要であり、近年は残留毒性の少なさや簡便さの点から、 γ 線や電子線を用いた放射線滅菌法が多用されている。すなわち、本発明の方法を医療用基材に用いると、基材の滅菌と改質が同時に達成できるので、好ましい。特に人工腎臓は、分離膜が水を抱液した状態である、いわゆるウェットタイプが主流となっているため、この水を親水性高分子溶液を含む水溶液に変えるだけで、本発明の方法が簡便に使用できるため、好ましい。

基材の滅菌と改質を同時に行う場合は、20 kGy以上の吸収線量で放射線の

照射を行うことが好ましい。血液浄化用モジュール等を γ 線で滅菌するには20 kGy以上の吸収線量が効果的なためである。しかしながら、吸収線量が20 kGy以上であると、親水性高分子の3次元架橋や崩壊などが起きるため、血液適合性が低下する。そのため、本発明においては、抗酸化剤を添加することが好ましい。具体的には、基材を親水性高分子および抗酸化剤を含む水溶液と接触下、放射線照射する。抗酸化剤の添加により、親水性高分子を固定化しつつ、親水性高分子の必要以上の架橋や崩壊を防止し、滅菌も同時に行うことができる。ただし、滅菌が不要な用途に用いる場合は、この吸収線量に限定される必要はない。その場合、15 kGy以下の吸収線量で放射線の照射を行うことで、抗酸化剤無しで基材の改質を行うことも可能である。

また、本発明でいうところの抗酸化剤とは、他の分子に電子を与えやすい性質を持つ分子のことを言う。抗酸化剤は、ポリビニルピロリドンなどの親水性高分子が放射線によりラジカル反応を起こす際、その反応を抑制する性質を持つ。抗酸化剤としては、例えば、ビタミンCなどの水溶性ビタミン類、ポリフェノール類、メタノール、エタノール、プロパノール、エチレングリコール、グリセリンなどのアルコール類、グルコース、ガラクトース、マンノース、トレハロースなどの糖類、ソジウムハイドロサルファイト、ピロ亜硫酸ナトリウム、ニチオン酸ナトリウムなどの無機塩類、尿酸、システイン、グルタチオン、酸素などが挙げられる。これらの抗酸化剤は単独で用いてもよいし、2種類以上混合して用いてもよい。本発明の方法を医療用具に用いる際は、その安全性を考慮する必要があるため、抗酸化剤は毒性の低いものが好適に用いられる。特に、アルコール類、糖類および無機塩類が好ましい。

水溶液中の抗酸化剤の濃度については、抗酸化剤の種類、放射線の照射線量などにより異なる。抗酸化剤の濃度が低すぎると、親水性高分子の3次元架橋や崩壊などが起きるため、血液適合性が低下するおそれがある。また、抗酸化剤を多量に入れると、基材への固定化効率が落ちるため、十分な血液適合性が得られないおそれがある。

以下に、本発明の改質基材の製造方法を、抗酸化剤を用いた場合の例について

詳述する。

基材の改質方法としては、基材を、親水性高分子および抗酸化剤を含む水溶液に接触させた状態で、放射線を照射する。例えば、基材がフィルムの場合、基材を親水性高分子および抗酸化剤を含む水溶液に浸漬させた状態で、放射線照射
5 することが好ましい。また、基材が中空糸膜等の中空基材で、かつ、親水性を付与させたい部分が中空部内表面の場合、中空部内部に前記の水溶液を充填し、放射線照射することが好ましい。さらに、基材がモジュールに内蔵されている場合は、モジュール内を前記の水溶液で充填して、モジュールごと放射線照射することも好ましい。例えば、人工腎臓ならば、モジュールケース内に分離膜が内蔵さ
10 れているため、親水性高分子および抗酸化剤を含む水溶液をモジュール内に充填し、モジュールごと放射線照射してもよいし、分離膜のみを親水性高分子および抗酸化剤を含む水溶液に浸漬させた状態で放射線照射してから、モジュールに組み込んでも良い。しかし、改質と滅菌を同時に行えることから、親水性高分子および抗酸化剤を含む水溶液をモジュール内に充填し、モジュールごと放射線照射
15 することが、より好ましい。

また、基材を、親水性高分子および抗酸化剤を含む水溶液で湿潤させた状態で、放射線を照射することも好ましい。ここでいう湿潤状態とは、基材を浸漬していた水溶液を除去するが、乾燥させない状態のことを言う。特に限定されるものではないが、基材の乾燥状態に対して1重量%以上の水分を含んでいることが好ま
20 しい。すなわち、基材を前記水溶液に浸漬し、該水溶液から引き上げた後、放射線を照射してもよい。また、基材を含むモジュール内に、前記水溶液を充填した後、窒素ブローなどにより、水溶液の大部分をモジュール内から排出した後、放射線を照射してもよい。

これら以外の方法としては、基材をあらかじめ親水性高分子水溶液に浸漬する
25 などして、基材表面に親水性高分子をコーティングした後、抗酸化剤を含む溶液に浸漬して γ 線照射を行っても良い。この場合も基材表面が効率よく親水化される。

親水性高分子を付与する場所は、基材の種類および改質の方法によって様々に

コントロールすることが可能である。例えば、基材が中空糸膜の場合であって、中空糸膜の内側に親水性高分子を含む水溶液を通した後に放射線を照射する場合は、中空糸膜の内表面に親水性高分子を固定することができる。人工腎臓のように内表面のみ血液を流す目的で用いられる場合は好ましい方法である。また、中空糸膜の外側にも親水化を行いたい場合は、中空糸膜の外側にも親水性高分子を含む水溶液を接触させればよい。例えば、中空糸膜がモジュールケースに内蔵されている場合は、中空糸膜とモジュールケースの間の空間に、親水性高分子を含む水溶液を充填すればよい。

また、基材が分離膜である場合に、親水性高分子を含む水溶液を、膜を通して濾過しながら充填した場合、膜の表面に親水性高分子が濃縮されるため、表面をより親水化させたい場合は効果的な手法である。この時、親水性高分子として、膜を透過しにくい高分子、例えば高分子量の親水性高分子を用いると、膜の表面に親水性高分子がより濃縮されるため、より高い効果が得られる。

一方、低分子量の親水性高分子を用いた場合は、膜内部まで親水化処理を行うことが可能である。例えば濾過もしくは透析により生体物質を分離し一部を回収する膜、いわゆる生体成分分離膜、においては、膜の表面だけを親水化しただけでは、膜内部での生体成分の吸着を抑制することができない。そのため、生体成分分離膜においては、膜内部まで親水化処理を行うことが好ましい形態である。

本発明においては、複数の基材を含むシステムを親水性高分子および抗酸化剤を含む水溶液と接触させて、該複数の基材に同時に放射線照射することにより、複数の基材を一度に改質することもできる。特に、該複数の基材が、それぞれ異なる素材からなる場合は、効果が大きい。通常の改質方法では、基材に対する依存性が大きいので、異なる素材からなる複数の基材を同時に改質することは困難である。

ここで、複数の基材から構成されているシステムとは、ポート部、分離膜および回路を含む分離膜システムなどである。例えば、人工腎臓、外毒素吸着カラムなどの血液浄化用モジュールは、カテーテル、血液回路、チャンバー、モジュールの入口および出口のポート部、分離膜など異なる素材からなる複数の基材から

構成されている。本発明ではこれらの全てもしくは一部を同時に改質することが可能である。ポート部、分離膜および回路のうち、少なくとも一部が改質されていることが好ましい。一例としては、人工腎臓システムの場合は、中空糸膜モジュールに、モジュールの入口および出口のポート部および血液回路を接続し、血液回路から親水性高分子水溶液を通液して、システム全体に充填した状態で放射線照射を行えばよい。

血液浄化用モジュールの製造方法としては、その用途により、種々の方法があるが、大まかな工程としては、血液浄化用の分離膜の製造工程と、その分離膜をモジュールに組み込むという工程にわけることができる。

- 10 人工腎臓に用いられる中空糸膜モジュールの製造方法についての一例を示す。人工腎臓に内蔵される中空糸膜の製造方法としては、つぎのような方法がある。すなわち、ポリスルホンおよびポリビニルピロリドンに良溶媒または良溶媒を含む混合溶媒に溶解させたものを原液とする。ポリマー濃度は、10～30重量%が好ましく、15～25重量%がより好ましい。ポリスルホンおよびポリビニル
- 15 ピロリドンの重量比率は、20：1～1：5が好ましく、5：1～1：1がより好ましい。良溶媒としては、N，N-ジメチルアセトアミド、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、N-メチルピロリドン、ジオキサンなどが好ましい。該原液を二重環状口金の外側の管から吐出し、乾式部を走行させた後凝固浴へ導く。二重環状口金の内側の管からは、中空部を形成するための注入液もしくは
- 20 は気体を吐出する。この際、乾式部の湿度が影響を与えるために、乾式部走行中に膜外表面からの水分補給によって、外表面近傍での相分離挙動を速め、孔径拡大し、結果として透析の際の透過／拡散抵抗を減らすことも可能である。ただし、相対湿度が高すぎると外表面での原液凝固が支配的になり、かえって孔径が小さくなり、結果として透析の際の透過／拡散抵抗を増大する傾向がある。そのため、
- 25 相対湿度としては60～90%が好適である。また、注入液組成としては、プロセス適性から、原液に用いた溶媒を基本とする組成からなるものを用いることが好ましい。注入液濃度としては、例えばジメチルアセトアミドを用いたときは、45～80重量%、さらには60～75重量%の水溶液が好適に用いられる。

中空糸膜をモジュールに内蔵する方法としては、特に限定されないが、一例を示すと次の通りである。まず、中空糸膜を必要な長さに切断し、必要本数を束ねた後、筒状ケースに入れる。その後両端に仮のキャップをし、中空糸膜両端部にポッティング剤を入れる。このとき遠心機でモジュールを回転させながらポッティング剤を入れる方法は、ポッティング剤が均一に充填されるために好ましい方法である。ポッティング剤が固化した後、中空糸膜の両端が開口するように両端部を切断し、中空糸膜モジュールを得る。

このようにして得られた中空糸膜モジュールを用いた人工腎臓システムの基本構造の一例を第1図に示す。円筒状のプラスチックケース7に中空糸膜5の束が挿入されており、中空糸の両端部を樹脂10で封止されている。ケース7には透析液の導入口8および導出口9が設けられており、中空糸膜5の外部には透析液、生食、濾過水等が流れるようになっている。ケース7の端部にはそれぞれ入口側ポート部1および出口側ポート部2が設けられている。血液6は入口側ポート部1に設けた血液導入口3より導入され、漏斗状のポート部1によって、中空糸膜5の内部に導かれる。中空糸膜5によってろ過された血液6は、出口側ポート部2によって集合させられ、血液導出口4より排出される。血液導入口3および血液導出口4には、血液回路11が接続される。

以下実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明はこれらの例によって限定されるものではない。

1. 基材の作成方法

(ポリスルホンフィルム1の作製)

ポリスルホン（テイジンアモコ社製ユーデル（登録商標）P-3500）10重量部をN，N'-ジメチルアセトアミド80重量部に加え、室温にて溶解し、製膜原液を得た。ホットプレートを用いて、表面温度が100度になるように加熱したガラス板上に、前記製膜原液を厚さ203 μ mになるようにキャストした。表面の温度は、接触式温度計により測定した。キャスト後、5分間ホットプレート上で放置し、溶媒を蒸発させた後、ガラス板ごと、水浴へ浸漬しポリスルホンフィルム1を得た。ここで、水浴に浸漬させるのは、ポリスルホンフィルムをガ

ラス板からはがしやすくさせるためである。

(中空糸膜モジュール1の作製)

ポリスルホン（テイジンアモコ社製ユーデル（登録商標）P-3500）18重量部およびポリビニルピロリドン（BASF社製K30）9重量部をN, N'-ジメチルアセトアミド72重量部および水1重量部の混合溶媒に加え、90℃
5 で14時間加熱して溶解し、製膜原液を得た。この製膜原液を外径0.3mm、内径0.2mmのオリフィス型二重円筒型口金の外側の管より吐出した。芯液としてN, N'-ジメチルアセトアミド58重量部および水42重量部からなる溶液を内側の管より吐出した。吐出された製膜原液は、乾式長350mmを通過し
10 た後、水100%の凝固浴に導かれ、中空糸が得られた。

得られた中空糸を10000本、第1図に示すような、透析液入口および透析液出口を有する円筒状のプラスチックケースに挿入し、両端部を樹脂で封止して、有効膜面積1.6m²の人工腎臓用中空糸膜モジュール1を作成した。

(中空糸膜モジュール2の作成)

15 iso（アイソタクティック）-ポリメチルメタクリレート5重量部およびsyn（シンジオタクティック）-ポリメチルメタクリレート20重量部をジメチルスルホキシド75重量部に加え、加熱溶解し、製膜原液を得た。この製膜原液をオリフィス型二重円筒型口金の外側の管より吐出し、空气中を200mm通過した後、水100%の凝固浴中に導き中空糸を得た。この際、内部注入気体として乾燥窒素
20 を内側の管より吐出した。得られた中空糸の内径は0.2mm、膜厚は0.03mmであった。中空糸膜モジュール1と同様にして、得られた中空糸を10000本用いて、有効膜面積1.6m²の中空糸膜モジュール2を作成した。

2. 測定方法

(1) 可溶性親水性高分子量の測定

25 測定サンプルを乾燥して乾燥重量を測定した後、基材と親水性高分子の両方を溶解できる溶媒に溶解する。この溶液に、親水性高分子は溶解するが、基材は溶解しない溶媒を添加する。この操作により、基材および基材に固定化された親水性高分子は沈殿する。一方、可溶性親水性高分子は、溶解したままである。この

上澄み液に含まれる親水性高分子の量を、HPLC（高速液体クロマトグラフィー）によって定量することにより、測定サンプルの単位重量あたりに含まれる可溶性親水性高分子の重量が求められる。一方、測定サンプルを元素分析することにより、測定サンプルの単位重量あたりに含まれる全親水性高分子の重量が求められる。測定サンプルの単位重量あたりの可溶性親水性高分子の重量を測定サンプルの単位重量あたりの全親水性高分子の重量で割った値が、可溶性親水性高分子量である。

親水性高分子が、ポリビニルピロリドン、基材がユーデル（登録商標）P-3500の場合には、以下の通りにして測定した。乾燥した測定サンプルを、N-メチル-2-ピロリドンに2.5重量%の濃度になるように溶解した。その溶液を攪拌しながら、水を数滴ずつ1.7倍量添加して、基材のポリマーを析出させた。このときに水を一気に加えると、ポリスルホンが可溶性のポリビニルピロリドンを巻き込んだ状態で析出してしまい、正確な測定ができない可能性があるため注意を要する。可溶性のポリビニルピロリドンは、分散したポリスルホン微粒子とともに溶液中に含まれる。溶液をHPLC用の非水系フィルター（東ソー製、2.5 μ 径）でろ過して、溶液中のポリスルホン微粒子を除去した後、ろ液中に含まれるポリビニルピロリドンを、以下の条件でHPLCにて定量した。

装置：Waters、GPC-244

カラム：TSK gel GMPWXL 2本

溶媒：水系、0.1M塩化アンモニウム、0.1Nアンモニア、pH 9.5

流速：1.0 ml/min

温度：23℃

ろ液中に含まれるポリビニルピロリドンの量から測定サンプルの単位重量あたりに含まれる可溶性ポリビニルピロリドンの重量が求められた。それを元素分析から求めた測定サンプルの単位重量あたりに含まれる全ポリビニルピロリドンの重量で割った値が可溶性ポリビニルピロリドン量である。

（2）親水性高分子の溶出性試験

測定サンプルを浸漬している親水性高分子水溶液を取り除いた後、改質基材の

表面部分の面積に対して、 0.25 ml/cm^2 量の水に、測定サンプルを 37°C 、4 時間浸漬することによって、溶出した親水性高分子を定量する。

測定サンプルが、前記の中空糸膜モジュール 1 の場合には、以下のようにして測定した。中空糸膜モジュール 1 の血液側を室温の超純水 700 ml で洗浄し、
5 透析液側を室温の超純水 2500 ml で洗浄した後、再び血液側を室温の超純水 300 ml で洗浄し、充填液中に元からある親水性高分子を洗い流した。その後、血液側を 37°C に加温した 4000 ml の超純水で流速 200 ml/min で 4 時間灌流した。その後、灌流液を 200 倍に濃縮し、GPC (ゲル・パーミエーション・クロマトグラフィー) にて測定した。その値から、灌流液中に溶出した
10 親水性高分子の総量を算出した。親水性高分子がポリビニルピロリドンの場合、GPC の測定条件としては、カラムは GMPWXL を使用し、流速 0.5 ml/min 、溶媒は 0.1 N の硝酸リチウムを添加したメタノール：水 = 1 : 1 (容積比) の混合溶媒、カラム温度 40°C で行った。ポリビニルピロリドン濃度の検量線には、BASF 社製 K90 を用いた。

15 (3) 紫外吸収値の最大増加値の測定

測定サンプルと接触している親水性高分子水溶液の放射線照射前後の、波長 260 nm から 300 nm の範囲の紫外吸収値を測定した。測定に供する水溶液約 3 ml を光路長 1 cm の石英セルに入れて、日立社製 U-2000 形分光光度計を用いて、室温にて測定した。放射線照射後の紫外吸収値から放射線照射前の紫外吸収値を引いて、紫外吸収値の増加値を求めた。波長 260 nm から 300 nm の範囲で最大の増加値を、紫外吸収値の最大増加値とした。
20

測定サンプルが中空糸膜モジュールで、親水性高分子水溶液を血液側に充填した場合は、放射線照射後の水溶液は、自然落下で滴下してくる分だけをサンプリングした。なお、親水性高分子水溶液を血液側に充填した後、ブローなどにより
25 排液し、湿潤状態で放射線照射した場合には、水溶液が自然落下で滴下しない場合もある。その時には、水をモジュール内に再度充填した後、室温で 1 時間以上放置後、自然落下で滴下した血液側の水をサンプリングすればよい。

中空糸膜モジュール以外の基材を、湿潤状態で放射線照射した場合には、基材

を $0.1 \text{ ml} / \text{cm}^2$ 量の水に室温で1時間、浸漬した後、その水を測定し、その測定値を20倍にした値を採用する。これは前記の中空糸膜モジュールの内表面積に対する、血液側の充填液の量、すなわち、浴比が $0.005 \text{ ml} / \text{cm}^2$ であるので、それと浴比を一致するように換算することを意味する。 $0.1 \text{ ml} / \text{cm}^2$ 量の水で、基材が浸漬しない場合は、適宜、水量を増加して測定し、浴比が $0.005 \text{ ml} / \text{cm}^2$ に相当するように換算すればよい。

(4) 表面親水性高分子量の測定

表面の親水性高分子量は、X線光電子分光法 (ESCA) によって測定した。測定装置として ESCALAB 220 i XL を用い、サンプルを装置にセットして、X線の入射角に対する検出器の角度は9.0度にて測定を行った。サンプルがフィルムの場合は、キャスト時のガラス面を測定した。また、サンプルが中空糸膜の場合は、中空糸膜を片刃で半円筒状にそぎ切り、中空糸膜の内表面を測定した。測定サンプルは、超純水でリンスした後、室温、 0.5 Torr にて10時間乾燥させた後、測定に供した。

15 親水性高分子がポリビニルピロリドン、基材がユーデル (登録商標) P-3500 の場合には、ESCA の測定により得られた、 C1s 、 N1s 、 S2p スペクトルの面積強度より、装置付属の相対感度係数を用いて窒素の表面量 (a) と硫黄の表面量 (b) を求め、下式より表面ポリビニルピロリドン量を算出した。

$$\text{表面ポリビニルピロリドン量 (重量\%)} = a \times 100 / (a \times 111 + b \times 442)$$

20

(5) ポリエチレングリコールの固定化密度の測定

放射線照射後の中空糸を、基材表面積 1 m^2 あたり1 l の 37°C の蒸留水に1時間浸漬し、蒸留水中に溶出するポリエチレングリコール量が 1 mg 以下になるまで蒸留水を交換しながら洗浄し、基材に固定化されていないポリエチレングリ

25 コールを取り除いた。洗浄した基材を 50°C 、 0.5 Torr にて10時間乾燥した。乾燥した基材 $10 \sim 100 \text{ mg}$ を試験管に取り、無水酢酸とパラトルエンスルホン酸の混合溶液 2 ml を添加し、 120° で約1時間アセチル化した。冷却後 2 ml の純水で器壁を洗い落とした後、 20% 炭酸水素ナトリウムで中和し

た。中和した溶液をトリクロロメタン 5 ml で抽出し、抽出物をガスクロマトグラフィー（以下 GC と略す）で分析した。GC 分析条件を以下に示す。予め作成した検量線を用いて、基材に固定化しているポリエチレングリコール量を求めた。

（GC 分析条件）

5 装置：Shimazu GC-9A

カラム：Supelcowax-10 60m×0.75mm I.D.

キャリアーガス：ヘリウム

検出器：FID (H₂ inlet:0.7kg/cm², Air inlet:0.6kg/cm², Temp.:200°C)

カラム温度：80°C 5min hold-(20min)-200°C 5min hold

10 インジェクター温度：200°C

（6）接触角の測定

協和界面化学社製の接触角計 CA-D を用いて測定した。測定は室温が 25 度に温調された部屋で行った。

（7）フィルムのウサギ血小板付着試験方法

15 測定するフィルムを 18mmφ のポリスチレン製の円筒管の底に平板状に設置し、該円筒管を生理食塩水で満たした。フィルム表面に汚れや傷、折り目などがあると、その部分に血小板が付着し、正しい評価ができないことがあるので注意を要する。3.2%クエン酸三ナトリウム 2 水和物水溶液と家兎新鮮血を 1:9（容積比）で混合した血液を 1000rpm で 10 分間遠心分離し、上清を取り
20 出した（血漿 1 とする）。その後、上清を取り出したあとの血液を 3000rpm で 10 分間再度遠心分離し、上清を取り出した（血漿 2 とする）。血漿 1 に血漿 2 を添加することで希釈（血漿 2 は血漿 1 に比べて血小板の濃度が低い）し、血小板数 20×10^6 個/ml の富血小板血漿（PRP と称する）を調製した。準備した円筒管の生理食塩水を捨てた後、PRP を 1.0ml 入れて 37°C にて
25 1 時間振盪した。その後、測定フィルムを生理食塩水で 3 回洗浄し、3%グルタルアルデヒド水溶液で血液成分の固定を行い、蒸留水にて洗浄した後、減圧乾燥を 5 時間以上行った。

このフィルムを走査型電子顕微鏡の試料台に両面テープで貼り付けた後、スパ

ッタリングにより、Pt-Pdの薄膜を表面に形成させて、試料とした。走査型電子顕微鏡（日立社製S800）にて試料表面を観察した。フィルムと円筒管の接着部は血液が溜まりやすいので、主としてフィルム中央部を倍率3000倍で観察し、1視野中（ $1.12 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ）の付着血小板数を数えた。フィルム中央付近で異なる10視野での付着血小板数の平均値を1.12で割った値を血小板付着数（個/ $1.0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ）とした。

(8) フィルムのヒト血小板付着試験方法

18mmφのポリスチレン製の円形板に両面テープで貼り付け、測定するフィルムを固定した。フィルム表面に汚れや傷、折り目などがあると、その部分に血小板が付着し、正しい評価ができないことがあるので注意を要する。筒状に切ったFalcon（登録商標）チューブ（18mmφ、No. 2051）に該円形板を、フィルムを貼り付けた面が、円筒内部にくるように取り付け、パラフィルムで隙間を埋めた。この円筒管内を生理食塩水で洗浄後、生理食塩水で満たした。人間の静脈血を採血後、直ちにヘパリンを50U/mlになるように添加した。前記円筒管内の生理食塩水を廃棄後、前記血液を、採血後10分以内に、円筒管内に1.0ml入れて、37℃にて1時間振盪させた。その後、測定フィルムを10mlの生理食塩水で洗浄し、2.5%グルタルアルデヒド生理食塩水で血液成分の固定を行い、20mlの蒸留水にて洗浄した。洗浄したフィルムを、常温0.5 Torrにて10時間減圧乾燥した。その後、スパッタリングにより、Pt-Pdの薄膜をフィルム表面に形成させて、試料とした。フィールドエミッション型走査型電子顕微鏡（日立社製S800）にて、倍率1500倍で試料表面を観察し、1視野中（ $4.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ）の付着血小板数を数えた。フィルム中央付近で異なる10視野での付着血小板数の平均値を血小板付着数（個/ $4.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ）とした。

(9) 中空糸膜のウサギ血小板付着試験方法

中空糸分離膜を30本束ね、中空糸中空部を閉塞しないようにエポキシ系ポッティング剤で両末端をガラス管モジュールケースに固定し、ミニモジュールを作成した。該ミニモジュールの直径は約7mm、長さは約10cmであった。該ミ

ニモジュールの血液入口と透析液出口をシリコンチューブで繋ぎ、血液出口から蒸留水100mlを10ml/minの流速で流し、中空糸およびモジュール内部を洗浄した。その後、生理食塩水を充填し、透析液入口、出口をキャップした。次に、血液入口から、0.59ml/minの流速で、2時間生理食塩水ブラ

5 ライミングした後、3.2%クエン酸三ナトリウム2水和物水溶液と家兎新鮮血を1:9（容積比）で混合した血液7mlを0.59ml/minの流速で1時間灌流した。その後、生理食塩水で10mlシリンジにて洗浄し、3%グルタルアルデヒド水溶液を中空糸内部および透析液側の両方に充填し、一晚以上置き、

10 グルタルアルデヒド固定を行った。その後、蒸留水にて、グルタルアルデヒドを洗浄し、ミニモジュールから中空糸膜を切り出して減圧乾燥を5時間以上行った。中空糸膜を走査型電子顕微鏡の試料台に両面テープで貼り付けた後、長手方向にスライスし、内表面を露出させた。その後、スパッタリングにより、Pt-Pdの薄膜を試料に形成させた。走査型電子顕微鏡（日立社製S800）にて、倍率3000倍で試料の内表面を観察し、1視野中（ $1.12 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ）の付着

15 血小板数を数えた。異なる10視野での付着血小板数の平均値を1.12で割った値を血小板付着数（個/ $1.0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ ）とした。

（10）中空糸膜のヒト血小板付着試験方法

18mmφのポリスチレン製の円形板に両面テープを貼り付け、そこに中空糸膜を固定した。貼り付けた中空糸膜を片刃で半円筒状にそぎ切り、中空糸膜の内

20 表面を露出させた。中空糸内表面に汚れや傷、折り目などがあると、その部分に血小板が付着し、正しい評価ができないことがあるので注意を要する。筒状に切ったFalcon（登録商標）チューブ（18mmφ、No. 2051）に該円形板を、中空糸膜を貼り付けた面が、円筒内部にくるように取り付け、パラフィルムで隙間を埋めた。この円筒管内を生理食塩水で洗浄後、生理食塩水で満たし

25 た。人間の静脈血を採血後、直ちにヘパリンを50U/mlになるように添加した。前記円筒管内の生理食塩水を廃棄後、前記血液を、採血後10分以内に、円筒管内に1.0ml入れて37℃にて1時間振盪させた。その後、中空糸膜を10mlの生理食塩水で洗浄し、2.5%グルタルアルデヒド生理食塩水で血液成

分の固定を行い、20 ml の蒸留水にて洗浄した。洗浄した中空糸膜を常温 0.5 Torr にて 10 時間減圧乾燥した。このフィルムを走査型電子顕微鏡の試料台に両面テープで貼り付けた。その後、スパッタリングにより、Pt-Pd の薄膜を中空糸膜表面に形成させて、試料とした。この中空糸膜の内表面をフィールドエミッション型走査型電子顕微鏡（日立社製 S800）にて、倍率 1500 倍で試料の内表面を観察し、1 視野中 ($4.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) の付着血小板数を数えた。中空糸長手方向における中央付近で、異なる 10 視野での付着血小板数の平均値を血小板付着数 (個 / $4.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) とした。中空糸の長手方向における端の部分は、血液溜まりができやすいためである。

10 (11) 人工腎臓用血液回路のヒト血小板付着試験方法

人工腎臓用血液回路を 0.1 g (メッシュ部分の場合は 0.01 g) 程度の小片に細断した。細断した小片について、上記の (9) 項と同様にして、ヒト血小板付着試験を行った。

なお、上記 (7) ~ (11) 項の血小板付着試験においては、試験が適切に行われているかどうかを確認するために、ポジティブコントロールとネガティブコントロールを実験毎に水準に入れる。ポジティブコントロールとは、血小板付着が多いことがわかっている既知のサンプルである。また、ネガティブコントロールとは、血小板付着が少ないことがわかっている既知のサンプルである。ヒト血小板付着試験においては、上記の実験条件で血小板付着数が、40 (個 / $4.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) 以上のサンプルを、ポジティブコントロールとする。また同様に、血小板付着数が 5 (個 / $4.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) 以下のサンプルを、ネガティブコントロールとする。ウサギ血小板付着実験においては、血小板付着数が、30 (個 / $1.0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) 以上のサンプルをポジティブコントロール、5 (個 / $1.0 \times 10^3 \mu\text{m}^2$) 以下のサンプルをネガティブコントロールとする。以下の実施例では、ポジティブコントロールとして、東レ社製人工腎臓“フィルトライザー”BG-1.6U の中空糸膜を、ネガティブコントロールとしては川澄化学社製人工腎臓PS-1.6UW の中空糸膜を用いた。試験を行った後、ポジティブコントロールの血小板付着数が、上記の値以上であり、かつ、ネガティブコン

ルの血小板付着数が、上記の値以下であったときに、測定値を採用する。コントロールの血小板付着数が上記範囲からはずれた場合は、血液の鮮度が欠けていたり、血液の過度な活性化が生じていることなどが考えられるので、試験をやり直す。

5 (1.2) IL-6 吸着試験

中空糸膜モジュール2に用いたのと同じ中空糸分離膜を30本束ね、中空糸中空部を閉塞しないようにエポキシ系ポッティング剤で両末端をガラス管モジュールケースに固定し、ミニモジュールを作成した。該ミニモジュールの直径は約7 mm、長さは約10 cmであった。該ミニモジュールの血液入口と透析液出口をシリコンチューブで繋ぎ、血液出口から蒸留水100 mlを10 ml/minの流速で流し、中空糸およびモジュール内部を洗浄した。その後、PBS（日本製薬社製ダルベッコPBS（-））水溶液を充填し、透析液入口、出口をキャップした。

15 ヒト血漿10 mlに、IL-6を添加し、1 ng/ml濃度に調整した（液1とする）。透析液入口と透析液出口をキャップし、血液側入口と血液側出口をシリコンチューブでつなぎ、液1を1 ml/minの流速で37℃、4時間灌流させた。灌流前後のIL-6を定量し、IL-6の減少量から基材への吸着量を算出した。

(1.3) 酸化LDL吸着除去試験方法

20 (a) 抗酸化LDL抗体の作製

板部らが作製したものをを用いた(H. Itabe et al., J. Biol. Chem. 269:15274, 1994)。すなわち、ヒト粥状硬化病巣ホモジェネートをマウスに注射して免疫し、そのマウスの脾臓からハイブリドーマを作製し、硫酸銅処理LDLと反応するものを選別して、抗酸化LDL抗体を得た。得られた抗酸化LDL抗体の抗体クラスは、マウスIgMで、未処理LDL、アセチルLDL、マロンジアルデヒドLDLとは反応しない。一方、該抗酸化LDL抗体は、フォスファチジルコリンのアルデヒド誘導体やヒドロペルオキシドを含めていくつかのフォスファチジルコリン過酸化反応生成物と反応する。該抗酸化LDL抗体を150 mMのNaClを含む

10 mM ほう酸緩衝液 (pH 8.5) に溶解したものをを用いた (蛋白質濃度 0.60 mg/ml)。

(b) 酸化 LDL の調製

市販の LDL (フナコシ製) を脱塩した後、0.2 mg/ml となるようにリン酸緩衝液 (以下、PBS と略記) で希釈した。その後、0.5 mM 硫酸銅水溶液を 2 wt% 添加し、37℃ で 5 時間反応させた。得られた溶液に、25 mM のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を 1 wt%、10 wt% アジ化ナトリウムを 0.02 wt% となるように添加したものを酸化 LDL 標品とした。

(c) 酸化 LDL 濃度の測定

10 前記抗酸化 LDL 抗体を PBS で 5 µg/ml に希釈し、96 穴のプレートに 100 µl / ウェルずつ分注した。室温で 2 時間震盪した後、4℃ にて一晚以上放置し、抗体を壁に吸着させた。

ウェル中の抗体溶液を捨て、1% Bovine Serum Albumin (BSA、フラクシオン V、生化学工業) を含む トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) を 200 µl / ウェルずつ分注した。室温で 2 時間震盪して壁をブロッキングした後、ウェル中の BSA 溶液を捨て、酸化 LDL を含んだ血漿および検量線作成用のスタンダードを 100 µl / ウェルずつ分注した。その後、室温で 30 分震盪した後、4℃ で一晚放置した。

室温に戻し、ウェル中の溶液を捨て、0.05% トウイーン (登録商標) - 20 を含む トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) でウェルを 3 回洗浄した。洗浄したウェルに PBS で 2000 倍に希釈した ヒツジ抗アポ B 抗体 100 µl / ウェルずつ分注した。室温で 2 時間震盪した後、ウェル中の抗アポ B 抗体を捨て、0.05% トウイーン - 20 を含む トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) でウェルを 3 回洗浄した。洗浄したウェルに 2% ブロックエース (大日本製薬) を含む トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) で 2000 倍に希釈した アルカリ性フォスファターゼ標識ロバ抗ヒツジ IgG 抗体を 100 µl / ウェルずつ分注し、室温で 2 時間震盪した。その後、ウェル中の標識抗体を捨て、0.05% トウイーン - 20 を含む トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) でウェルを 3 回洗浄し、さらに トリス-

塩酸緩衝液 (pH 8.0) で2回洗浄した。続いて、p-ニトロフェニルリン酸の1mg/ml溶液 (0.0005M $MgCl_2$ 、1Mジエタノールアミン緩衝液、pH 9.8) を100 μ l/ウェルずつ分注した。適当な時間室温で反応させた後、波長415nmにおける吸光度をプレートリーダーで測定した。スタンダードの結果から検量線を引き、酸化LDL濃度を決定した。

(d) 酸化LDL吸着除去率の測定

健康者血漿 (日本人、30歳、LDL (β リポ蛋白) 濃度275mg/dl, HDL-コレステロール濃度70mg/dl) に、上記酸化LDLを濃度2 μ g/mlとなるように添加した。

- 10 中空糸膜を70本束ね、直径約7mm、長さは12cmのガラス管モジュールケースに挿入した。中空糸膜の両末端を、中空糸膜中空部を閉塞しないようにエポキシ系ポッティング剤で固定し、ミニモジュール (内表面積53 cm^2) を作成した。ミニモジュールを超純水で37℃で3.0分間洗浄した。その後、ミニモジュールの両端に内径7mm (外径10mm)、長さ2cmのシリコンチューブ (製品名ARAM (登録商標)) と異形コネクタを介して、内径0.8mm、外径1mm、長さ37cmのシリコンチューブ (製品名ARAM (登録商標)) をつなぎ、上記血漿1.5mlを窒素雰囲気下で0.5ml/分の流量で25℃、4時間中空糸膜内に灌流した。中空糸膜表面積1 m^2 あたりの血漿量は2.8 $\times 10^2$ ml/ m^2 であった。さらにミニモジュールをつけずにシリコンチューブのみで灌流操作も行った。灌流前後の血漿中の酸化LDL濃度を定量することにより、それぞれの吸着除去率を下記式により算出した。

酸化LDL吸着除去率 (%) = ミニモジュールでの酸化LDL吸着除去率 (%)
- シリコンチューブのみでの酸化LDL吸着除去率 (%)

$$25 \quad \text{酸化LDL吸着除去率 (\%)} = 100 \times (\text{灌流前の濃度} - \text{灌流後の濃度}) / \text{灌流前の濃度}$$

(実施例1)

基材として、前記のポリスルホンフィルム1を用いた。親水性高分子としてポリビニルピロリドン (BASF社製K90) 0.1重量%および抗酸化剤として

エタノール 0.5 重量%含む水溶液に基材を浸漬し、 γ 線照射した。 γ 線吸収線量は 27 kGy であった。該フィルムを純水でリンスした後、80℃の純水中で 60 分間攪拌し、純水を入れ替え再び 80℃で 60 分間攪拌した後、さらに純水を入れ替え 80℃で 60 分間攪拌し、吸着しているポリビニルピロリドンを取り除いた。該フィルムの表面ポリビニルピロリドン量の測定、表面の接触角の測定、血小板付着試験および可溶性親水性高分子量の測定をそれぞれ行った。その結果、表 1 に示された通り、可溶性親水性高分子量が少なく、親水性が高く、血小板数が少ない、血液適合性の高いポリスルホンフィルムが得られたことがわかった。

(比較例 1)

前記のポリスルホンフィルム 1 を、純水中で γ 線照射した。 γ 線吸収線量は 28 kGy であった。該フィルムを純水でリンスし、80℃の純水中で 60 分間攪拌し、純水を入れ替え再び 80℃で 60 分間攪拌した後、さらに純水を入れ替え 80℃で 60 分間攪拌した。該フィルムの表面ポリビニルピロリドン量の測定、表面の接触角の測定、血小板付着試験および可溶性親水性高分子量の測定をそれぞれ行った。その結果、表 1 に示された通り、実施例 1 と比較して血小板付着数が多く血液適合性の低いポリスルホンフィルムが得られたことがわかった。

(比較例 2)

前記のポリスルホンフィルム 1 を、親水性高分子としてポリビニルピロリドン (BASF 社製 K90) 0.1 重量%、抗酸化剤としてエタノール 0.5 重量%を含む水溶液中で 3 日間室温にて放置した。その後、該フィルムを純水でリンスし、80℃の純水中で 60 分間攪拌し、純水を入れ替え再び 80℃で 60 分間攪拌した後、さらに純水を入れ替え 80℃で 60 分間攪拌した。該フィルムの表面ポリビニルピロリドン量の測定、表面の接触角の測定、血小板付着試験および可溶性親水性高分子量の測定をそれぞれ行った。その結果、表 1 に示された通り、実施例 1 と比較して接触角が大きく親水性が低く、血小板付着数が多い血液適合性の低いポリスルホンフィルムが得られたことがわかった。

(比較例 3)

前記のポリスルホンフィルム 1 に γ 線を照射しないで、該フィルムを純水でリ

- 5 ンスし、80℃の純水中で60分間攪拌し、純水を入れ替え再び80℃で60分間攪拌した後、さらに純水を入れ替え80℃で60分間攪拌した。該フィルムの表面ポリビニルピロリドン量の測定、表面の接触角の測定、血小板付着試験および可溶性親水性高分子量の測定をそれぞれ行った。その結果、表1に示された通り、実施例1と比較して接触角が大きく親水性が低く、血小板付着数が多い血液適合性の低いポリスルホンフィルムが得られたことがわかった。

表1-1

	γ線吸収線量	親水性高分子	抗酸化剤	表面ポリビニルピロリドン量
実施例1	27kGy	ポリビニルピロリドン 0.1wt%	エタノール 0.5wt%	21重量%
比較例1	28kGy	なし	なし	<2重量%
比較例2	0kGy	ポリビニルピロリドン 0.1wt%	エタノール 0.5wt%	5重量%
比較例3	0kGy	なし	なし	<2重量%

表1-2

	接触角	ヒト血小板付着数 (個/ $4.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$)	ウサギ血小板付着数 (個/ $10^3 \mu\text{m}^2$)	可溶性親水性高分子量(%)
実施例1	41°	0.1	0.1	0.2
比較例1	43°	83	60	0
比較例2	80°	78	50	0.1
比較例3	82°	77	58	0

10 (実施例2)

- 親水性高分子としてポリビニルピロリドン(BASF社製K90)0.1重量%、抗酸化剤としてエタノール0.5重量%を含む水溶液を、前記の中空糸膜モジュール1の血液側および透析液側に、それぞれ1000ml通液し、モジュール内を該水溶液で充填した。この後、該モジュールにγ線照射した。γ線吸収線量は
15 29kGyであった。該モジュールについて、ポリビニルピロリドンの溶出性試験を行った結果、ポリビニルピロリドンの溶出量は0.15mg/m²であった。

また、該モジュールの中空糸を切り出し、表面ポリビニルピロリドン量、可溶性親水性高分子量および血小板付着数を評価した。その結果、表 2 に示された通りであった。

(実施例 3)

- 5 親水性高分子としてポリビニルピロリドン(BASF社製K90)0.1重量%、抗酸化剤としてピロ亜硫酸ナトリウム500ppmを含む水溶液を、前記の中空糸膜モジュール1の血液側および透析液側に、それぞれ1000ml通液し、モジュール内を該水溶液で充填した。この後、該モジュールに γ 線照射した。 γ 線吸収線量は29kGyであった。該モジュールの中空糸を切り出し、表面ポリビ
- 10 ニルピロリドン量、可溶性親水性高分子量および血小板付着数を評価した。その結果、表 2 に示された通りであった。

(比較例 4)

- 純水を、前記の中空糸膜モジュール1の血液側および透析液側にそれぞれ1000ml通液し、モジュール内を純水で充填した。この後、該モジュールに γ 線
- 15 照射した。 γ 線吸収線量は28kGyであった。該モジュールの中空糸を切り出し、表面ポリビニルピロリドン量、可溶性親水性高分子量および血小板付着数を評価した。その結果、表 2 に示された通り、実施例 2, 3 と比較して血小板付着数が多かった。また、該モジュールの血液側充填液の、 γ 線照射による波長260nmから300nmの範囲における紫外吸収値の最大増加値を測定した。さら
- 20 に、中空糸膜モジュール1と同じ中空糸膜を用いてミニモジュールを作成し、酸化LDL吸着実験に供した。結果は表 3 に示したように、カチオン性親水性高分子を固定化した中空糸膜に比べて、酸化LDL吸着除去率は低かった。

(比較例 5)

- 親水性高分子としてポリビニルピロリドン(BASF社製K90)0.1重量%
- 25 を含む水溶液を、前記の中空糸膜モジュール1の血液側および透析液側に、それぞれ1000ml通液し、モジュール内を該水溶液で充填した。この後、該モジュールに γ 線照射した。 γ 線吸収線量は29kGyであった。該モジュールの中空糸を切り出し、表面ポリビニルピロリドン量、可溶性親水性高分子量および血

血小板付着数を評価した。その結果、表 2 に示された通り、実施例 2, 3 と比較して血小板付着数が多かった。

(比較例 6)

抗酸化剤としてエタノール 0.5 重量%を含む水溶液を、前記の中空糸膜モジュール 1 の血液側および透析液側に、それぞれ 1000 ml 通液し、モジュール内を該水溶液で充填した。この後、該モジュールに γ 線照射した。 γ 線吸収線量は 29 kGy であった。該モジュールの中空糸を切り出し、表面ポリビニルピロリドン量、可溶性親水性高分子量および血小板付着数を評価した。その結果、表 2 に示された通り、実施例 2, 3 と比較して血小板付着数が多かった。

(比較例 7)

抗酸化剤として 50.0 ppm のピロ亜硫酸ナトリウムを含む水溶液を、前記の中空糸膜モジュール 1 の血液側および透析液側に、それぞれ 1000 ml 通液し、モジュール内を該水溶液で充填した。この後、該モジュールに γ 線照射した。 γ 線吸収線量は 29 kGy であった。該モジュールの中空糸を切り出し、表面ポリビニルピロリドン量、可溶性親水性高分子量および血小板付着数を評価した。その結果、表 2 に示された通り、実施例 2, 3 と比較して血小板付着数が多かった。

(比較例 8)

親水性高分子としてポリビニルピロリドン(BASF 社製 K90) 0.1 重量%、抗酸化剤としてエタノール 0.5 重量%を含む水溶液を、前記の中空糸膜モジュール 1 の血液側および透析液側に、それぞれ 1000 ml 通液し、モジュール内を該水溶液で充填した。充填後 3 日間室温で放置した後、該モジュールについて、ポリビニルピロリドンの溶出性試験を行った。その結果、ポリビニルピロリドンの溶出量が 0.68 mg/m^2 であり、実施例 2 と比較してポリビニルピロリドンの溶出量が多かった。該モジュールの中空糸を切り出し、表面ポリビニルピロリドン量、可溶性親水性高分子量および血小板付着数を評価した。その結果、表 2 に示された通りであった。すなわち、 γ 線照射を行っていないので、血小板付着数は低かったが、ポリビニルピロリドンのグラフト化や、架橋が起きていないため、ポリビニルピロリドンの溶出量が多かったと考えられる。

表2-1

	γ 線吸収線量	親水性高分子	抗酸化剤
実施例2	29kGy	ポリビニルピロリドン 0.1wt%	エタノール 0.5wt%
実施例3	29kGy	ポリビニルピロリドン 0.1wt%	ピロ亜硫酸ナトリウム 500ppm
比較例4	28kGy	なし	なし
比較例5	29kGy	ポリビニルピロリドン 0.1wt%	なし
比較例6	29kGy	なし	エタノール 0.5wt%
比較例7	29kGy	なし	ピロ亜硫酸ナトリウム 500ppm
比較例8	0kGy	ポリビニルピロリドン 0.1wt%	エタノール 0.5wt%

表2-2

	ヒト血小板付着数 (個/ $4.3 \times 10^3 \mu m^2$)	ウサギ血小板付着数 (個/ $10^3 \mu m^2$)	可溶性親水性 高分子量(%)
実施例2	0.1	0.1	9
実施例3	0.1	0.1	8.5
比較例4	65	48	3.5
比較例5	30	25	3.6
比較例6	25	22	9.7
比較例7	31	18	9.5
比較例8	0.5	1	73.3

(実施例4)

- 5 ノニオン性親水性高分子としてポリビニルピロリドン (BASF社製K90) 0.1重量%、カチオン性親水性高分子としてポリエチレンイミン (BASF社製、重量平均分子量100万) 0.1重量%を含む水溶液を、前記中空糸膜モジュール1の血液側および透析液側に、それぞれ1000ml通液し、モジュール

内を該水溶液で充填した。この後、該モジュールに γ 線照射した。 γ 線吸収線量は27 kGyであった。該モジュールの血液側充填液の、 γ 線照射による波長260 nmから300 nmの範囲における紫外吸収値の最大増加値を測定した。該モジュールの中空糸を切り出し、血小板付着数を評価した。さらに、中空糸膜モジュール1と同じ中空糸膜を用いてミニモジュールを作成し、酸化LDL吸着実験に供した。その結果、表3に示された通りであった。その結果を表3に示した。

(実施例5)

カチオン性親水性高分子としてポリエチレンイミン (BASF社製、重量平均分子量100万) 0.1重量%、抗酸化剤としてエタノールを含む水溶液を、前記中空糸膜モジュール1の血液側および透析液側に、それぞれ1000 ml 通液し、モジュール内を該水溶液で充填した。この後、該モジュールに γ 線照射した。 γ 線吸収線量は29 kGyであった。該モジュールの血液側充填液の、 γ 線照射による波長260 nmから300 nmの範囲における紫外吸収値の最大増加値を測定した。その結果、表3に示したように、比較例9に比べて紫外吸収値の最大増加値が低く抑えられていることがわかった。該モジュールの中空糸を切り出し、血小板付着数を評価した。さらに、中空糸膜モジュール1と同じ中空糸膜を用いてミニモジュールを作成し、酸化LDL吸着実験に供した。結果を表3に示した。

(比較例9)

カチオン性親水性高分子としてポリエチレンイミン (BASF社製、重量平均分子量100万) 0.1重量%を含む水溶液を、前記中空糸膜モジュール1の血液側および透析液側に、それぞれ1000 ml 通液し、モジュール内を該水溶液で充填した。この後、該モジュールに γ 線照射した。 γ 線吸収線量は28 kGyであった。該モジュールの血液側充填液の、 γ 線照射による波長260 nmから300 nmの範囲における紫外吸収値の最大増加値を測定した。該モジュールの中空糸を切り出し、血小板付着数を評価した。さらに、中空糸膜モジュール1と同じ中空糸膜を用いてミニモジュールを作成し、酸化LDL吸着実験に供した。その結果、表3に示された通り、実施例4と比較して血小板付着数が多かった。

表3-1

	γ線吸収線量	ノニオン性親水性高分子	カチオン性親水性高分子	抗酸化剤
実施例4	27kGy	ポリビニルピロリドン 0.1wt%	ポリエチレンイミン 0.1wt%	なし
実施例5	29kGy	なし	ポリエチレンイミン 0.1wt%	エタノール 0.5wt%
比較例9	28kGy	なし	ポリエチレンイミン 0.1wt%	なし
比較例4	28kGy	なし	なし	なし

表3-2

	ヒト血小板付着数 (個/ $4.3 \times 10^3 \mu m^2$)	可溶性親水性 高分子量(%)	紫外吸収値の最 大増加値	酸化LDL吸着除 去率(%)
実施例4	0.2	10	0.60	26
実施例5	12	12	0.25	27
比較例9	14	8.7	0.61	30
比較例4	65	3.5	0.15	10

(実施例6)

前記の中空糸膜モジュール2の血液側および透析液側に、それぞれ40℃の超
 5 純水5000mlを通液して洗浄した。その後、親水性高分子としてポリエチレ
 ングリコール（日本油脂社製マクロゴール（登録商標）6000）0.075重
 量%を含む水溶液を、血液側および透析液側にそれぞれ1000ml通液し、モ
 ジュール内を該水溶液で充填した。この後、該モジュールをγ線照射した。γ線
 10 吸収線量は28kGyであった。該モジュールについて、ポリエチレングリコー
 ル固定化密度測定、血小板付着試験およびIL-6吸着試験を行った。その結果、
 表4に示された通りであった。

(実施例7)

前記の中空糸膜モジュール2の血液側および透析液側に、それぞれ40℃の超
 純水5000mlを通液して洗浄した。その後、親水性高分子としてポリエチレ
 15 ングリコール（日本油脂製マクロゴール（登録商標）6000）0.100重量%

を含む水溶液を、該モジュールの血液側および透析液側にそれぞれ1000ml通液し、モジュール内を該水溶液で充填した。この後、該モジュールを γ 線照射した。 γ 線吸収線量は28kGyであった。該モジュールについて、ポリエチレングリコール固定化密度測定、血小板付着試験およびIL-6吸着試験を行った。

5 その結果、表4に示された通りであった。

(実施例8)

前記の中空糸膜モジュール2の血液側および透析液側に、それぞれ40℃の超純水5000mlを通液して洗浄した。その後、親水性高分子としてポリビニルピロリドン（ISP社製K90）0.100重量%を含む水溶液を、該モジュールの血液側および透析液側にそれぞれ1000ml通液し、モジュール内を該水溶液で充填した。この後、該モジュールを γ 線照射した。 γ 線吸収線量は28kGyであった。該モジュールについて、血小板付着試験およびIL-6吸着試験を行った。その結果、表4に示された通り、であった。

(比較例10)

15 前記の中空糸膜モジュール2の血液側および透析液側に、それぞれ40℃の超純水5000mlを通液して洗浄した。その後、親水性高分子としてポリエチレングリコール（日本油脂製マクロゴール（登録商標）6000）0.010重量%を含む水溶液を、該モジュールの血液側および透析液側にそれぞれ1000ml通液し、モジュール内を該水溶液で充填した。この後、該モジュールを γ 線照射した。 γ 線吸収線量は28kGyであった。該モジュールについて、ポリエチレングリコール固定化密度測定、血小板付着試験およびIL-6吸着試験を行った。その結果、表4に示された通りであった。

(比較例11)

25 前記の中空糸膜モジュール2の血液側および透析液側に、それぞれ40℃の超純水5000mlを通液して洗浄した。その後、親水性高分子としてポリエチレングリコール（ナカライテスク製ポリエチレングリコール#200）0.100重量%を含む水溶液を、該モジュールの血液側および透析液側にそれぞれ1000ml通液し、モジュール内を該水溶液で充填した。この後、該モジュールを γ

線照射した。γ線吸収線量は28 kGyであった。該モジュールについて、ポリエチレングリコール固定化密度測定、血小板付着試験およびIL-6吸着試験を行った。その結果、表4に示された通りであった。

(比較例12)

- 5 前記の中空糸膜モジュール2の血液側および透析液側に、それぞれ40℃の超純水5000mlを通液して洗浄した。その後、親水性高分子としてポリエチレングリコール (SCIENTIFIC POLYMERS PRODUCTS, INC. 製、Mw900,000) 0.100重量%を含む水溶液を、該モジュールの血液側および透析液側にそれぞれ1000ml通液し、モジュール内を該水溶液で充填した。この後、該モジュールを
- 10 γ線照射した。γ線吸収線量は28 kGyであった。該モジュールについて、ポリエチレングリコール固定化密度測定、血小板付着試験およびIL-6吸着試験を行った。その結果、表4に示された通りであった。

(比較例13)

- 15 前記の中空糸膜モジュール2の血液側および透析液側に、それぞれ40℃の超純水5000mlを通液して洗浄した。その後、モジュール内を超純水で充填し、該モジュールをγ線照射した。γ線吸収線量は28 kGyであった。該モジュールについて、血小板付着試験およびIL-6吸着試験を行った。その結果、表4に示された通りであった。

20 表4

	ヒト血小板付着数 (個/ $4.3 \times 10^3 \mu\text{m}^2$)	IL-6吸着量 (ng/cm ²)	ポリエチレングリコール固 定化密度 (mg/m ²)
実施例6	0.56	0.209	384
実施例7	0.43	0.180	353
実施例8	0.99	0.163	-
比較例10	3.23	0.032	137
比較例11	48.59	0.282	172
比較例12	0.56	0.053	239
比較例13	100以上	0.162	0

(実施例9)

市販の人工腎臓用血液回路（東レメディカル株式会社：「人工腎臓血液回路 H-102-KTS」）の人工腎臓モジュール血液側コネクター部分を細断して、小片 1 g を測定サンプルとした。親水性高分子としてポリビニルピロリドン（ISP 社製 K90）0.100 重量%、抗酸化剤としてエタノール 0.100 重量%を含む水溶液 60 ml に測定サンプルを浸漬し、 γ 線照射した。血小板付着試験を行った結果、表 5 に示すとおりであった。

（実施例 10）

市販の人工腎臓用血液回路（東レメディカル株式会社：「人工腎臓血液回路 H-102-KTS」）の血液チューブ部分を細断して、小片 1 g を測定サンプルとした。親水性高分子としてポリビニルピロリドン（ISP 社製 K90）0.100 重量%、抗酸化剤としてエタノール 0.100 重量%を含む水溶液 60 ml に測定サンプルを浸漬し、 γ 線照射した。血小板付着試験を行った結果、表 5 に示すとおりであった。

（実施例 11）

市販の人工腎臓用血液回路（東レメディカル株式会社発売「人工腎臓血液回路 H-102-KTS」）の血液チャンバー部分を細断して、小片 1 g を測定サンプルとした。親水性高分子としてポリビニルピロリドン（ISP 社製 K90）0.100 重量%、抗酸化剤としてエタノール 0.100 重量%を含む水溶液 60 ml に測定サンプルを浸漬し、 γ 線照射した。血小板付着試験を行った結果、表 5 に示すとおりであった。

（実施例 12）

市販の人工腎臓用血液回路（東レメディカル株式会社：「人工腎臓血液回路 H-102-KTS」）のメッシュ部分を細断して、小片 1 g を測定サンプルとした。親水性高分子としてポリビニルピロリドン（ISP 社製 K90）0.100 重量%、抗酸化剤としてエタノール 0.100 重量%を含む水溶液 60 ml に測定サンプルを浸漬し、 γ 線照射した。血小板付着試験を行った結果、表 5 に示すとおりであった。

（比較例 14）

市販の人工腎臓用血液回路（東レメディカル株式会社：「人工腎臓血液回路 H-102-KTS」）の人工腎臓モジュール血液側コネクター部分を細断して、血小板付着試験を行った結果、表 5 に示すとおりであった。

（比較例 15）

- 5 市販の人工腎臓用血液回路（東レメディカル株式会社：「人工腎臓血液回路 H-102-KTS」）の血液チューブ部分を細断して、血小板付着試験を行った結果、表 5 に示すとおりであった。

（比較例 16）

- 10 市販の人工腎臓用血液回路（東レメディカル株式会社：「人工腎臓血液回路 H-102-KTS」）の血液チャンバー部分を細断して、血小板付着試験を行った結果、表 5 に示すとおり血小板付着数は 7.0（個/ $4.3 \times 10^3 \mu m^2$ ）であった。

（比較例 17）

- 15 市販の人工腎臓用血液回路（東レメディカル株式会社：「人工腎臓血液回路 H-102-KTS」）のメッシュ部分を細断して、血小板付着試験を行った結果、表 5 に示すとおりであった。

表 5

	ヒト血小板付着数（個/ $4.3 \times 10^3 \mu m^2$ ）
実施例 9	0.67
実施例 10	0.67
実施例 11	0.33
実施例 12	29.00
比較例 14	5.67
比較例 15	3.33
比較例 16	7.00
比較例 17	100 以上

（実施例 13）

市販のガラス状炭素板（東洋炭素株式会社製）を基材として用いた。親水性高

分子としてポリビニルピロリドン（BASF社製K90）0.01重量%および抗酸化剤としてエタノール0.1重量%を含む水溶液に基材を浸漬し、 γ 線照射した。 γ 線吸収線量は27kGyであった。該フィルムを純水でリンスした後、80℃の純水中で60分間攪拌し、純水を入れ替え再び80℃で60分間攪拌した。その後、さらに純水を入れ替え80℃で60分間攪拌し、吸着しているポリビニルピロリドンを取り除いた。該フィルムの表面の接触角を測定した。その結果、接触角は39度であり、未処理の場合の98度に対して大幅に親水性化されていることがわかった。

（実施例14）

- 10 市販のガラス状炭素板（東洋炭素株式会社製）を基材として用いた。親水性高分子としてポリビニルピロリドン（BASF社製K90）0.01重量%を含む水溶液に基材を浸漬し、 γ 線照射した。 γ 線吸収線量は27kGyであった。該フィルムを純水でリンスした後、80℃の純水中で60分間攪拌し、純水を入れ替え再び80℃で60分間攪拌した。その後、さらに純水を入れ替え80℃で60分間攪拌し、吸着しているポリビニルピロリドンを取り除いた。該フィルムの表面の接触角を測定した。その結果、接触角は52度であり、未処理の場合の98度に対して大幅に親水性化されていることがわかった。

（比較例18）

- 20 実施例13のガラス状炭素板を、純水中で γ 線照射した。 γ 線吸収線量は28kGyであった。該フィルムを純水でリンスし、80℃の純水中で60分間攪拌し、純水を入れ替え再び80℃で60分間攪拌した。その後、さらに純水を入れ替え80℃で60分間攪拌した。該フィルムの表面の接触角は98度であり未処理の場合の98度と同じであることがわかった。

（実施例15）

- 25 市販のカーボンシート（東レ株式会社製）を基材として用いた。親水性高分子としてポリビニルピロリドン（BASF社製K90）0.1重量%および抗酸化剤としてエタノール0.1重量%含む水溶液に基材を浸漬し、 γ 線照射した。 γ 線吸収線量は27kGyであった。該フィルムを純水でリンスした後、80℃の

純水中で60分間攪拌し、純水を入れ替え再び80℃で60分間攪拌した。その後、さらに純水を入れ替え80℃で60分間攪拌し、吸着しているポリビニルピロリドンを取り除いた。該フィルムの表面の接触角を測定した。その結果、接触角は30度であり、未処理の場合の131度に対して大幅に親水性化されていることがわかった。

産業上の利用可能性

本発明の改質基材は、表面に親水性高分子が固定化されており、かつ、親水性高分子の必要以上の架橋、崩壊などが防止されているので、タンパク質などの有機物や生体成分の付着を抑制することができる。特に、高い血液適合性を有する。また、サイトカインの吸着を維持しつつ、高い血液適合性を得ることができる。

本発明の改質基材は、表面に親水性が要求される用途に幅広く用いることができる。例えば、人工血管、カテーテル、血液バッグ、血液フィルター、コンタクトレンズ、眼内レンズ、人工腎臓、人工肺、手術用補助器具などの医療用具に好適に用いることができる。アミノ酸、ペプチド、糖、タンパク質あるいはこれらの複合体等の生体成分を分離する生体成分分離膜にも好適に用いることができる。ピペットチップ、チューブ、シャーレ、スピッツなどのバイオ実験関連器具、バイオリアクター、分子モーター、DDS、タンパクチップ、DNAチップ、バイオセンサー、あるいは、AFM（原子間力顕微鏡）、SNOM（近接場光学顕微鏡）、SPR（表面プラズモン共鳴）センサーなどの分析機器部品などにも好適に用いることができる。また、浄水器用膜、上水浄化膜、下水浄化膜、RO膜などの水処理用分離膜にも好適に用いることができる。なかでも生体成分と接触させて用いられる用途、例えば人工腎臓などの血液浄化用モジュールに好適に用いられる。

請 求 の 範 囲

1. 親水性高分子を含み、可溶性親水性高分子量が15重量%以下であり、かつ、ヒト血小板付着量が10個/4.3×10³μm²以下である改質基材。

5 2. 基材を親水性高分子水溶液と接触させて放射線照射することによって得られうる請求の範囲第1項記載の改質基材。

3. 親水性高分子水溶液において、放射線照射による、波長260nmから300nmの範囲における紫外吸収値の最大増加値が1以下である請求の範囲第2項記載の改質基材。

10 4. 基材を親水性高分子および抗酸化剤を含む水溶液と接触させて放射線照射することによって得られうる請求の範囲第2項記載の改質基材。

5. 親水性高分子水溶液において、放射線照射後による、波長260nmから300nmの範囲における紫外吸収値の最大増加値が1以下である請求の範囲第4項記載の改質基材。

15 6. 表面親水性高分子量が20重量%以上である請求の範囲第1項記載の改質基材。

7. 複数の親水性高分子を含む請求の範囲第1項記載の改質基材。

8. カチオン性親水性高分子および非イオン性親水性高分子を含む請求の範囲第7項記載の改質基材。

20 9. アニオン性親水性高分子および非イオン性親水性高分子を含む請求の範囲第7項記載の改質基材。

10. 親水性高分子の溶出量が0.5mg/m²以下である請求の範囲第1項記載の改質基材。

25 11. 親水性高分子がポリアルキレングリコールまたはポリビニルピロリドンである請求の範囲第1項に記載の改質基材。

12. 親水性高分子が生体由来高分子である請求の範囲第1項記載の改質基材。

13. インターロイキン-6吸着量が0.1ng/cm²以上である請求の

範囲第 1 項記載の改質基材。

1 4. 親水性高分子がポリアルキレングリコールであり、かつ、該ポリアルキレングリコールの固定化密度が $150 \sim 3000 \text{ mg/m}^2$ である請求の範囲第 1 3 項記載の改質基材。

5 1 5. 基材が疎水性高分子からなる請求の範囲第 1 3 項記載の改質基材。

1 6. 疎水性高分子がポリメタクリル酸メチルである請求の範囲第 1 5 項記載の改質基材。

1 7. 医療用基材である請求の範囲第 1 項記載の改質基材。

1 8. 基材を親水性高分子および抗酸化剤を含む水溶液と接触させて放射線
10 照射することによって得られうる改質基材。

1 9. 請求の範囲第 1 項記載の改質基材を用いた分離膜。

2 0. 中空糸膜である請求の範囲第 1 9 項記載の分離膜。

2 1. 中空糸膜の内表面に親水性高分子が結合している請求の範囲第 2 0 項記載の分離膜。

15 2 2. 中空糸膜の内部にも親水性高分子が結合している請求の範囲第 2 1 項記載の分離膜。

2 3. 請求の範囲第 1 9 項記載の分離膜を用いた生体成分分離膜。

2 4. 請求の範囲第 1 項記載の改質基材を複数含むシステム。

2 5. 異なる素材からなる複数の改質基材を含む請求の範囲第 2 4 項記載の
20 システム。

2 6. システムが、ポート部、分離膜および回路を含む分離膜システムであって、ポート部、分離膜および回路の少なくとも一部が改質基材である請求の範囲第 2 4 項記載のシステム。

2 7. 基材を親水性高分子および抗酸化剤を含む水溶液と接触下、放射線照
25 射する改質基材の製造方法。

2 8. 親水性高分子および抗酸化剤を含む水溶液に基材を浸漬させることにより、該基材と該水溶液を接触させる請求の範囲第 2 7 項記載の改質基材の製造方法。

29. 放射線照射後の改質基材のサイトカイン吸着量が、改質前の基材のサイトカイン吸着量の90%以上である請求の範囲第27項記載の改質基材の製造方法。

5 30. サイトカインがIL-6である請求の範囲第29項記載の改質基材の製造方法。

31. 基材が疎水性高分子からなる請求の範囲第29項記載の改質基材の製造方法。

32. 基材が分離膜である請求の範囲第27項記載の改質基材の製造方法。

10 33. 分離膜が中空糸膜である請求の範囲第32項記載の改質基材の製造方法。

34. 中空糸膜の内側に親水性高分子および抗酸化剤を含む水溶液を充填することによって、該中空糸膜と該水溶液を接触させる請求の範囲第33項記載の改質基材の製造方法。

15 35. 中空糸膜の外側にも前記水溶液を接触させる請求の範囲第34項記載の改質基材の製造方法。

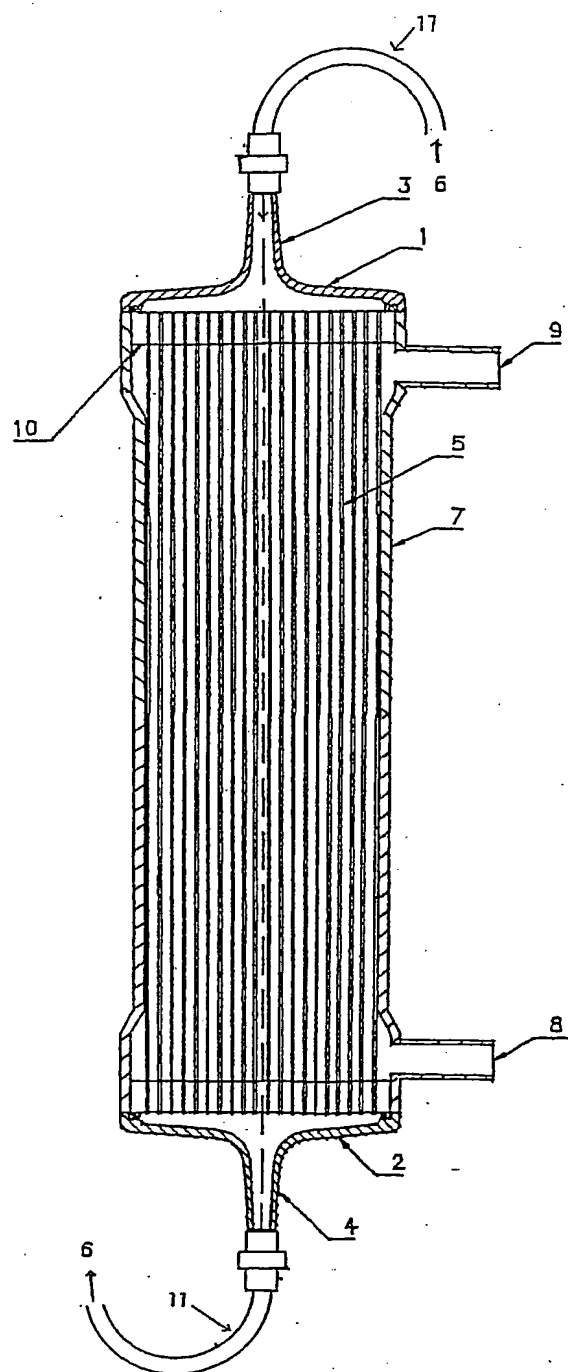
36. 前記水溶液を、分離膜を通して濾過することによって、該分離膜と該水溶液を接触させる請求の範囲第32項記載の改質基材の製造方法。

37. 複数の基材を含むシステムを親水性高分子および抗酸化剤を含む水溶液と接触させて、該複数の基材に同時に放射線照射するシステムの製造方法。

20 38. 異なる素材からなる複数の基材を含むシステムを親水性高分子および抗酸化剤を含む水溶液と接触させて、該複数の基材に同時に放射線照射する請求の範囲第37項記載のシステムの製造方法。

25 39. システムが、ポート部、分離膜および回路を含む分離膜システムであって、該分離膜システムを親水性高分子および抗酸化剤を含む水溶液と接触させた状態で、該分離膜システム全体に放射線照射する請求の範囲第37項記載のシステムの製造方法。

第1図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National application No.

PCT/JP03/10488

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ B01D67/00, 63/02, 65/02, 69/08, 71/40, C08J7/18, 7/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ B01D61/00-71/82, A61M1/00-1/38

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 63-097634 A (Toray Industries, Inc.), 28 April, 1988 (28.04.88), Claims	1-3, 6, 7, 10-17, 19-26
Y	(Family: none)	4, 5, 18, 27-39
A		8, 9
Y	JP 63-209663 A (Asahi Medical Co., Ltd.), 31 August, 1988 (31.08.88), Claims	4, 5, 18, 27-39
	(Family: none)	
Y	JP 3076080 B2 (Asahi Chemical Industry Co., Ltd.), 09 June, 2000 (09.06.00), (Family: none)	4, 5, 18, 27-39

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 November, 2003 (07.11.03)Date of mailing of the international search report
25 November, 2003 (25.11.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10488

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5658466 A (TEIJIN LTD.), 19 August, 1997 (19.08.97), Abstract & JP 8-010320 A	4, 5, 18, 27-39
X	JP 2000-237557 A (Toray Industries, Inc.), 05 September, 2000 (05.09.00), Claims (Family: none)	1
X	JP 11-047570 A (Toray Industries, Inc.), 23 February, 1999 (23.02.99), Claims (Family: none)	1
X	JP 6-238139 A (Asahi Medical Co., Ltd.), 30 August, 1994 (30.08.94), Claims (Family: none)	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/10488

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This international application contains three inventions not satisfying the requirement of unity of invention, namely, main invention (claims 1 to 3, 6, 7, 10 to 17, 19 to 26), second invention (claims 4, 5, 18, 27 to 39) and third invention (claims 8, 9). The technical feature of invention recited in claim 1 cannot be regarded as "special technical features" in view of the prior art described in JP 63-97634 A (Toray Industries, Inc.) 28 April, 1988 (28.04.88). Thus, among the above main invention, second invention and third invention there is no technical relationship involving one or more of the same or corresponding special technical features.
(continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No. II of continuation of first sheet(1)

Consequently, it cannot be recognized that the main invention, second invention and third invention constitute a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. Dependent claims 2, 3, 6, 7, 10 to 17 and 19 to 26 not requiring excess search of prior art references or directed only to addition of matter of design are included in the same category of invention as that of the main invention.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ B01D67/00, 63/02, 65/02, 69/08, 71/40,
C08J7/18, 7/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ B01D61/00-71/82, A61M1/00-1/38

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1926-1996
日本国公開実用新案公報	1971-2003
日本国登録実用新案公報	1994-2003
日本国実用新案登録公報	1996-2003

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 63-097634 A (東レ株式会社), 1988. 04. 28, 特許請求の範囲, (ファミリーなし)	1-3, 6, 7, 10-17, 19-26
Y		4, 5, 18, 27-39
A		8, 9
Y	JP 63-209663 A (旭メディカル株式会社), 1988. 08. 31, 特許請求の範囲, (ファミリーなし)	4, 5, 18, 27-39

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって、出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は本質の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 11. 03

国際調査報告の発送日

25.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

目代 博茂



4D

9630

電話番号 03-3581-1101 内線 3421

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 3076080 B2 (旭化成工業株式会社) , 2000. 06. 09, (ファミリーなし)	4、5、18、27-39
Y	US 5658466 A (TEIJIN LIMITED) , 1997. 08. 19, ABSTRACT & JP 8-010320 A	4、5、18、27-39
X	JP 2000-237557 A (東レ株式会社) , 2000. 09. 05, 特許請求の範囲, (ファミリーなし)	1
X	JP 11-047570 A (東レ株式会社) , 1999. 02. 23, 特許請求の範囲, (ファミリーなし)	1
X	JP 6-238139 A (旭メディカル株式会社) , 1994. 08. 30, 特許請求の範囲, (ファミリーなし)	1

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

この国際出願は発明の単一性を満たさない3つの発明、すなわち、主発明(請求の範囲1-3、6、7、10-17、19-26)、第2発明(請求の範囲4、5、18、27-39)、第3発明(請求の範囲8、9)を含んでいる。請求の範囲1に記載された発明の技術的特徴は、文献JP 63-97634 A(東レ株式会社)、1988.04.28に記載の先行技術からみて「特別な技術的特徴」とはいえないから、上記主発明、第2発明及び第3発明相互間には、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係が存在しない。よって、上記主発明、第2発明及び第3発明は相互に、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。なお、過度の先行技術文献調査を要しないあるいは設計的事項の付加にすぎない従属請求の範囲2、3、6、7、10-17、19-26は、主発明と同じ発明区分とした。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。